体外苏氨酸循环固碳途径的构建

巨晓芝[1,2]，袁倩倩[2,3]，马春玲[2]，肖冬光[1]，马红武[2*1]

(1. 天津科技大学生物工程学院，天津科技大学，天津 300457;2. 中国科学院系统微生物工程重点实验室，中国科学院天津工业生物技术研究所，天津，300308；3. 天津大学化工学院，天津大学，天津 300072)

摘要：乙酰CoA是生物体代谢过程中重要的代谢物，也是许多有价值产品合成的前体物质。然而传统途径中通过丙酮酸脱羧生成乙酰CoA碳得率较低，因此构建一条高效的乙酰CoA合成途径具有重要的意义。本研究试图体外验证文献报道的高碳摩尔得率合成乙酰CoA的苏氨酸循环固碳途径，有较重要的理论意义和应用价值。本研究在体外构建了苏氨酸循环固碳途径合成乙酰CoA，通过分段加酶的方式将其在体外进行了验证。在体外验证时，以丙酮酸为底物，则丝氨酸脱氨酶（TdcB）为循环途径的最后一步反应。结果表明，当加入途径中除丝氨酸脱氨酶之外的酶时，测得的乙酰CoA浓度约1.5 mmol/L，待反应达到平衡时，加入丝氨酸脱氨酶，丝氨酸转化为丙酮酸，丙酮酸再次进入循环，乙酰CoA的量增加了约0.2 mmol/L，由此得出结论在体外苏氨酸循环实现了固碳。

关键词：体外；固碳途径；苏氨酸循环；乙酰CoA

中图分类号：[Q815]　　　文献标识码：A　　　文章编号：

In vitro construction of the threonine cycle pathway for carbon fixation

JU Xiao-zhi[1, 2], YUAN Qian-qian [2, 3], MA Chun-ling[1, 2], XIAO Dong-guang[1], MA Hong-wu[2,*]

(1.College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology,Tianjin 300457 China;2.Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;3. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

基金项目：国家重点基础研究计划(973 计划)(No.2012CB725203)；天津市科技支撑计划重点项目(No.14ZCZDSY00060) ；中科院重点部署项目（No.ZDRW-ZS-2016-3）

作者简介：巨晓芝(1990-)，女，硕士研究生，研究方向为合成生物学；E-mail: ju_xz@tib.cas.cn；联系电话：022-24828756

*通讯作者：马红武(1970-)，男，研究员，博士，研究方向为系统微生物学；E-mail: ma_hw@tib.cas.cn；

联系电话：022-24828735

Abstract：Acetyl-CoA is a central metabolite and an important precursor for the synthesis of many valuable products. However, the carbon yield of acetyl-CoA is relatively low due to the carbon loss at the pyruvate decarboxylation step. Therefore, it was of great significance to construct an effecient pathway for acetyl-CoA synthesis. This study attempts to validate the high carbon molar yield reported in the literature to synthesize acetyl-CoA threonine carbonization pathway, which has important theoretical significance and application value. In this study, carbon fixation pathway via threonine cycle was used to synthesize acetyl CoA in vitro. When pyruvate was used as the substrate, serine deaminase (TdcB) was the last step of the cycling pathway in the in vitro characterization. The results showed that when all enzymes except serine deaminase were added to the reaction system, the measured acetyl CoA concentration was about 1.5 mmol/L at an nearly equilibrium state. After serine deaminase was added, serine to pyruvate and re-entry into the circulation, acetyl CoA concentration was increased 0.2 mmol/L. This result indicated that carbon fixation was achieved via the threonine cycle in vitro.

Key words：In vitro; Carbon fixation pathway; Threonine cycle; Acetyl-CoA

乙酰 CoA 是微生物代谢过程中重要的中间代谢物，是许多有价值生化产品如丙酮、异丙醇、法尼烯和聚β-羟基丁酸（PHB）等的前体物质[1-6]。传统代谢途径中乙酰 CoA 是通过丙酮酸一步脱羧合成的，反应方程为：Pyruvate + CoA + $NADP^+$ => Acetyl-CoA + CO_2 + NAD，由方程可以看出每合成一分子乙酰 CoA 就会损失一分子 CO_2，丙酮酸到乙酰 CoA 的碳摩尔得率只有 0.667。为了寻找能够提高乙酰 CoA 得率的新途径，林等[7]对大肠杆菌模型 *iJO1366* 进行通量平衡分析[8]，发现了一条固碳新途径（见图 1），该途径中苏氨酸是重要的中间代谢物，因此林等将该途径命名为苏氨酸循环途径。图 1 中苏氨酸循环途径由丙酮酸到乙酰 CoA 的总反应方程为：Pyruvate + CO_2 + CoA + 3 NADPH + 6 ATP => 2 Acetyl-CoA + 3 NADP + 6 ADP。每分子丙酮酸可以通过固定一分子 CO_2 生成两分子乙酰 CoA，丙酮酸到乙酰 CoA 的碳摩尔得率达到了 1.33。林等在体内构建了该途径并用于生产 PHB。由于体内代谢网络复杂的代谢调控和反馈抑制等因素，很难确定该途径是否真正可行，因此本研究利用体外验证的方法，将苏氨酸

循环固碳途径的酶及辅酶进行纯化，在合适的缓冲液，合适的温度条件下，对苏氨酸循环固碳途径进行体外验证。

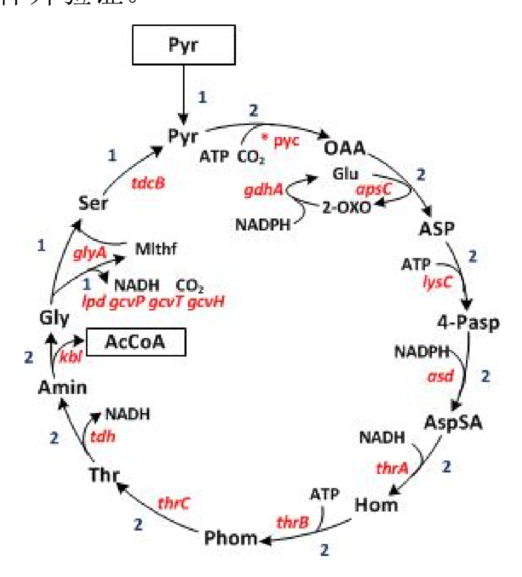


图 1 从丙酮酸出发的苏氨酸循环固碳途径。

Fig.1 Threonine cycle pathway for carbon fixation from Pyr.

The metabolites are: *Pyr* pyruvate, *OAA* oxaloacetate, *Asp* aspartate, *4-Pasp* aspartyl-4-phosphate, *AspSA* aspartate semialdehyde, *Hom* homoserine, *Phom* homoserine phosphate, *Thr* threonine, *Amin* 2-amino-3-ketobutyrate, *Gly* glycine, *Ser* serine, *MLTHF* methylene- methyltetrahydrofolate, *Glu* glutamate, *2-OXO* 2-oxoglutarate.

1.材料与方法

1.1 材料与仪器

反应及测定酶活时所用的底物丙酮酸，草酰乙酸，谷氨酸钠，天冬氨酸，甘氨酸，苏氨酸，高丝氨酸，ATP，ADP，NADH，NADPH，NAD^+，$NADP^+$，异丙基硫代半乳糖苷（IPTG），生物素等：北京索莱宝科技有限公司；乙酰CoA，CoA，磷酸吡哆醛（PLP），黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD），四氢叶酸，磷酸烯醇式丙酮酸（PEP），丙酮酸激酶（PK），乳酸脱氢酶（LDH）等：Sigma（USA）；磷酸二氢钠，邻苯二甲醛（OPA），色谱级甲醛，色谱级乙腈，色谱级异丙醇等：Agilent(USA)； Bradford试剂盒，DNA Marker等：GENE RAY(Shanghai,China)；Prime STAR mix、限制性内切酶、T_4 DNA连接酶、Protein Marker等：New England Biolabs。

V-1600可见分光光度计：上海森信实验仪器有限公司； Tecan infinite M200 PRO多功能微孔板检测仪：Tecan公司；1260 Infinity LC高效液相色谱分析仪(high performance liquid chromatography, HPLC)： Agilent公司； 高压细胞破碎仪

（JN-3000plus）：广州聚能生物科技有限公司，中国；冷冻大容量离心机（Sorvall Evolution RC）：Thermo Fisher，USA；蛋白纯化仪AKTA10-2：GE，瑞典。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建

应用Primer premier5.0软件设计引物，进行片段扩增。将扩增好的片段进行双酶切后，以pET28a作为载体，以*E. coli* BL21（DE3）为宿主，进行途径蛋白的表达纯化，基因来源及引物见表1。

表1 苏氨酸循环固碳途径蛋白的基因名称、基因来源及引物

Table 1 The gene names, gene sources and primers of protein of threonine cyclic carbon fixation pathway protein

蛋白名称	基因	基因来源	质粒	引物
丙酮酸羧化酶	*Pyc*	*Rhizobium etli*	pET-28a-Pyc	F-NheI-CTAGCTAGCTTGCCGATCAGCAAAATCCTGGTCG R-XhoI-CCGCTCGAGTCAGCCGCCGTAAACCGCCAGCAGG
天冬氨酸转氨酶	*Aspc*	*E.coli*	pET-28a-AspC	F-NdeI-GGGAATTCCATATGTTTGAGAACATTACCGCCGCTC R-HindIII-CCCAAGCTTTTACAGCACTGCCACAATCGCTTCG
天冬氨酸激酶	*Lysc*	*E.coli*	pET-28a-LysC	F-NdeI-GGGAATTCCATATGTTTGAGAACATTACCGCCGCTC R-XhoI-CCGCTCGAGTTACTCAAACAAATTACTATGCAGT
高丝氨酸脱氢酶	*thrA*	*E.coli*	pET-28a- thrA	F-NheI-CTAGCTAGCATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGGTA R-XhoI-CCGCTCGAGTCAGACTCCTAACTTCCATGAGAGG
天冬氨酸半醛脱氢酶	*Asd*	*E.coli*	pET-28a-Asd	F-NheI-CTAGCTAGCATGAAAAATGTTGGTTTTATCGGCT R-XhoI-CCGCTCGAGTTACGCCAGTTGACGAAGCATCCGA
高丝氨酸激酶	*thrB*	*E.coli*	pET-28a-thrB	F-NheI-CTAGCTAGCATGGTTAAAGTTTATGCCCCGGCTT R-XhoI-CCGCTCGAGTTAGTTTTCCAGTACTCGTGCGCCC
苏氨酸合成酶	*thrC*	*E.coli*	pET-28a-thrC	F-NheI-CTAGCTAGCATGAAACTCTACAATCTGAAAGATC R-XhoI-CCGCTCGAGTTACTGATGATTCATCATCAATTTA
苏氨酸脱氢酶	*Tdh*	*E.coli*	pET-28a-Tdh	F-NheI-CTAGCTAGCATGAAAGCGTTATCCAAACTGAAAG R-XhoI-CCGCTCGAGTTAATCCCAGCTCAGAATAACTTTC
2-氨基-3-酮丁酸辅酶A连	*Kbl*	*E.coli*	pET-28a-Kbl	F-NheI-CTAGCTAGCATGCGTGGAGAATTTTATCAGCAGT R-XhoI-CCGCTCGAGTCAGGCGATAACGCCCAGTTGTTTA
甘氨酸脱羧	*gcvP*	*E.coli*	pET-28a-gcvP	F-NheI-CTAGCTAGCATGACACAGACGTTA

酶				AGCCAGCT R-XhoI-CCGCTCGAGTTACTGGTATTCGCTAATCGGTACGC
	gcvH	*E.coli*	pET-28a-gcvH	F-NheI-CTAGCTAGCATGAGCAACGTACCAGCAGAACTGA R-XhoI-CCGCTCGAGTTACTCGTCTTCTAACAATGCTTCG
	gcvT	*E.coli*	pET-28a-gcvT	F-NheI-CTAGCTAGCATGAGCAACGTACCAGCAGAACT R-XhoI-CCGCTCGAGTTACTCGTCTTCTAACAATGCTTCGTA
	Lpd	*E.coli*	pET-28a-Lpd	F-NheI-CTAGCTAGCATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGG R-XhoI-CCGCTCGAGTTACTTCTTCTTCGCTTTCGGGTTC
丝氨酸羟甲基转移酶	*glyA*	*E.coli*	pET-28a-glyA	F-NdeI-GGGAATTCCATATGTTAAAGCGTGAAATGAACATTG R-HindIII-CCCAAGCTTTTATGCGTAAACCGGGTAACGTGCG
丝氨酸脱氨酶	*tdcB*	*E.coli*	pET-28a-tdcB	F-NheI-CTAGCTAGCATGCATATTACATACGATCTGCCGG R-XhoI-CCGCTCGAGTTAAGCGTCAACGAAACCGGTGATT

1.2.2 苏氨酸循环固碳途径蛋白的表达与纯化

将活化的目的菌株置于LB培养基（50 μg/mL Kanamycin）中，在37℃摇床中进行培养，待OD_{600}到0.6-0.8时， IPTG诱导（终浓度为0.5 mmol/L），诱导温度保持在16℃，诱导时间为16-20 h。

将诱导完的菌液在4℃，5000r/min离心10min，弃上清，收集菌体。收集的菌体用buffer A(150mmol/L Tris–HCl, 150mmol/L NaCl and 20 mmol/L 咪唑, pH 7.5)悬浮，用高压均质机破碎细胞，形成了蛋白和细胞碎片混合液，用4℃，10000 r/min离心30 min，取上清，进行蛋白的进一步纯化。

将上清置于亲和凝胶Ni^{2+}柱上，将buffer A和buffer B（150 mmol/L Tris–HCl, 150 mmol/L NaCl and 500 mmol/L 咪唑, pH 7.5）配置成不同浓度的咪唑(50 mmol/L, 100 mmol/L, 150 mmol/L, 200 mmol/L，250 mmol/L，500 mmol/L)，然后分别用不同浓度的咪唑进行洗脱，洗脱液用不同的收集管收集。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)验证，透析浓缩，收集目的蛋白，将收集的目的蛋白置于-80℃，备用。

1.2.3 酶浓度及酶活性的测定

利用蛋白浓度试剂盒Bradford法测量蛋白浓度。

酶活的测定主要是通过偶联丙酮酸激酶（PK）和乳酸脱氢酶（LDH），通

过动态检测NADH或者NADPH的消耗或者生成在OD_{340}时的变化，计算得到比酶活[9,10]。所有的反应都是在37℃下进行反应（50 mmol/L Bis-Tris, 25 mmol/L Tricine and 6 mmol/L $MgCl_2$ ，pH 7.5）。先将除酶以外的底物，辅因子，偶联的酶（PK和LDH），缓冲液加入96孔板中，将其在37℃下孵育2min后，将酶加入，在OD_{340}下检测NADH或者NADPH的动态变化。苏氨酸循环固碳途径中各蛋白比酶活的测定原理及反应方程见表2。

表2 苏氨酸循环固碳途径中各蛋白比酶活的测定原理及反应方程

Table 2 The measurement principles and reaction equations of specific activity of the enzymes in the threonine cyclic carbon fixation pathway

蛋白名称	原理	反应方程
(1) 丙酮酸脱羧酶（Pyc）	偶联偶联苹果酸脱氢酶（MDH）消耗 NADH	Pyc：丙酮酸+ ATP+CO2 =>草酰乙酸+ ADP + 磷酸 MDH：草酰乙酸+NADH+H^+<=>NAD^++(S)-苹果酸盐
(2) 天冬氨酸转氨酶（AspC）	偶联天冬氨酸激酶（LysC）、丙酮酸激酶（PK）和乳酸脱氢酶（LDH）消耗 NADH	AspC：草酰乙酸+L-谷氨酸盐=>L-天冬氨酸+2-酮戊二酸 LysC：L-天冬氨酸+ ATP=> ADP+4-磷酸-L-天冬氨酸 PK：磷酸烯醇式丙酮酸+ADP<=>丙酮酸+ ATP LDH：丙酮酸+ NADH+H^+=> NAD^++(R)-乳酸
(3) 天冬氨酸激酶（LysC）	偶联丙酮酸激酶（PK）和乳酸脱氢酶（LDH）消耗 NADH	LysC：L-天冬氨酸+ ATP=> ADP+4-磷酸-L-天冬氨酸 PK：磷酸烯醇式丙酮酸+ADP<=>丙酮酸+ ATP LDH：丙酮酸+ NADH+H^+=> NAD^++(R)-乳酸
(4) 天冬氨酸半醛脱氢酶（Asd）	偶联天冬氨酸激酶（LysC）消耗 NADPH	LysC：L-天冬氨酸+ ATP=> ADP+4-磷酸-L-天冬氨酸 Asd：4-磷酸-L天冬氨酸+ NADPH + H^+=>天冬氨酸半醛+$NADP^+$
(5) 高丝氨酸激酶（ThrB）	偶联丙酮酸激酶（PK）和乳酸脱氢酶（LDH）消耗 NADH	ThrB ：L-高丝氨酸+ ATP+H_2O=> ADP+2-磷酸-L-高丝氨酸 PK：磷酸烯醇式丙酮酸+ADP<=>丙酮酸+ ATP LDH：丙酮酸+ NADH+H^+=> NAD^++(R)-乳酸
(6) 苏氨酸脱氢酶（Tdh）	直接生成 NADH	Tdh：L-苏氨酸+NAD^+=>2-氨基-3-酮丁酸+NADH
(7) 甘氨酸脱羧酶	直接生成 NADH	GCV多酶体系：甘氨酸+四氢叶酸+ NAD^+<=>甲基四氢叶酸+NH_3+CO_2+NADH
(8) 丝氨酸脱氨酶（TdcB）	偶联乳酸脱氢酶（LDH）消耗 NADH	TdcB：L-丝氨酸=>丙酮酸+NH_3 LDH：丙酮酸+ NADH+H^+=> NAD^++(R)-乳酸

1.2.4 反应体系的建立

反应体系为 200μL，包括 5mmol/L 丙酮酸，10mmol/L NADPH，10mmol/L

ATP，10mmol/L NAD^+，20mmol/L 谷氨酸，10mmol/L HCO^{3-}，10mmol/L CoA，2mmol/L 四氢叶酸，0.1mmol/L PLP，0.1mmol/L FAD，丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶、天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、高丝氨酸激酶、苏氨酸脱氢酶、甘氨酸脱氨酶和丝氨酸脱氨酶各加入 0.5U/mL，高丝氨酸脱氢酶，苏氨酸合成酶，2-氨基-3-酮丁酸辅酶 A 连接酶和丝氨酸羟甲基转移酶加过量。反应的 buffer 为 50 mmol/L Bis-Tris，25 mmol/L Tricine 和 6 mmol/L $MgCl_2$，pH 7.5，反应温度为 37℃。

1.2.5 HPLC 的检测方法

氨基酸的HPLC检测方法：色谱柱为ZORBAX Eclipse AAA（4.6 mmol/L×150 mmol/L, Agilent, USA），柱温为40℃，流动相A为40 mmol/L Na_2HPO_4（pH =7.8），流动相B为甲醇：乙腈：水=45%：45%：10%（v/v/v），流速为2 mL/min，紫外检测波长为380nm。

乙酰CoA的HPLC检测方法：色谱柱为ZORBAX Eclipse Plus C18（4.6 mmol/L×250 mmol/L, Agilent, USA），柱温为40℃，流动相A为0.2 mol/L Na_2HPO_4（pH=5），流动相B为100%乙腈，恒定流速为0.3 mL/min，紫外检测波长为245nm。

2.结果与讨论

2.1 苏氨酸循环固碳途径蛋白的表达纯化

苏氨酸循环途径中除丙酮酸羧化酶来源于 *Rhizobium etli*[11]，其余的酶均来源于 *E. coli* MG1655。*E. coli* MG1655 中能表达丝氨酸脱氨酶的基因包括 *sdaA*、*sdaB*、*tdcG* 和 *tdcB*[12]，根据依赖的辅因子的类型可以分为两类：1.PLP 依赖型（*tdcB*）；2.Fe-S 离子簇依赖型（*sdaA*、*sdaB* 和 *tdcG*[13,14]。PLP 依赖型的丝氨酸脱氨酶是多功能酶，对丝氨酸和苏氨酸都可以进行脱氨作用，而依赖 Fe-S 离子簇的丝氨酸脱氢酶只对底物丝氨酸起作用[15]，但是由于 Fe-S 离子簇对氧极其敏感，空气中的氧就会使丝氨酸脱氨酶失活。体外研究需要将酶从生物体内提取纯化,不可避免的会有空气的摄入，因此在体外进行苏氨酸循环固碳的验证时选择了 PLP 依赖型的丝氨酸脱氨酶。将表达纯化的目的蛋白 100 ℃变性 10 min 后，SDS-PAGE 结果如图 2 所示。

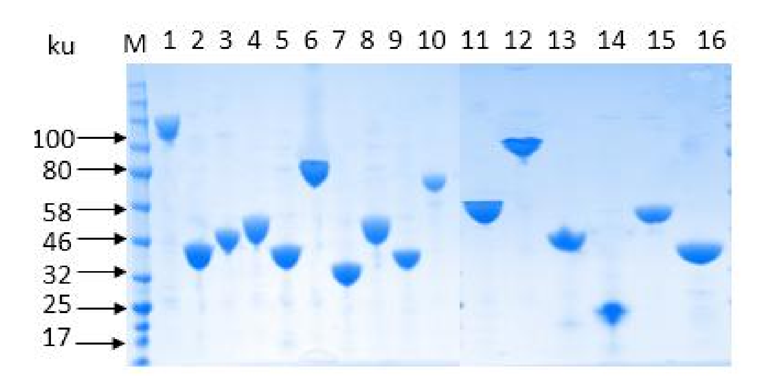


图 2 目的蛋白 SDS-PAGE 图谱分析

Fig. 2 The SDS-PAGE analysis of target genes

M: Protein marker; 1: pyruvate carboxylase-120ku; 2: aspartate aminotransferase-43ku; 3: glutamate dehydrogenase-48ku; 4: aspartate kinase-48ku; 5: aspartate semialdehyde dehydrogenase-40ku; 6: homoserine dehydrogenase-89 ku; 7: homoserine kinase-33ku; 8: threonine synthase-48ku; 9: threonine dehydrogenase-35ku; 10: 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase-85ku; 11: lipoamide dehydrogenase-56ku; 12: P- protein-93.3ku; 13: T-protein-43ku; 14: H- protein-14ku; 15: serine hydroxymethyltransferase-46ku; 16: serine deaminase-39ku.

由图 2 得出，蛋白条带正确，基本没有杂带，可以用于后续实验。

2.2 苏氨酸循环固碳途径蛋白的比酶活及 K_m 值测定结果

苏氨酸循环固碳途径蛋白比酶活和 K_m 的测定结果，见表 3。高丝氨酸脱氢酶，苏氨酸合成酶，2-氨基-3-酮丁酸辅酶 A 连接酶，丝氨酸羟甲基转移酶，因底物购买不到，不能测定比酶活和 K_m 值。

表 3 苏氨酸循环固碳途径蛋白比酶活和 K_m 的测定结果

Table 3 The results of enzyme specity activity and K_m of threonine circulating carbon fixation pathway protein

蛋白名称	比酶活（U/mg）	K_m（mmol/L）
丙酮酸羧化酶	0.432	K_m（pyr）=0.302，K_m（ATP）=0.052，K_m（HCO^{3-}）=0.286
天冬氨酸转氨酶	2.4	K_m（OAA）= 0.014，K_m（glu）=6.3
天冬氨酸激酶	10.32	K_m（asp）=0.03，K_m（ATP）=0.0236
高丝氨酸脱氢酶	------	------
天冬氨酸半醛脱氢酶	31.5	------
高丝氨酸激酶	42.86	K_m（hom）=0.087，K_m（ATP）=0.516
苏氨酸合成酶	------	------
苏氨酸脱氢酶	0.03	K_m（thr）=0.9，K_m（NAD）=0.25
2-氨基-3-酮丁酸辅酶	------	------

A 连		
甘氨酸脱羧酶	0.78	K_m（gly）=0.48，K_m（thf）=0.37
丝氨酸羟甲基转移酶	------	------
丝氨酸脱氨酶	0.72	K_m（ser）=1.9

2.3 苏氨酸循环固碳途径的体外验证

模型计算得到 1 摩尔丙酮酸固定一个 CO_2 经过苏氨酸循环固碳途径可以生成 2 摩尔乙酰 CoA，体外验证苏氨酸循环固碳途径是以丙酮酸为底物，加入途径中纯化的酶各 0.5 U/mL，不能测得比酶活的高丝氨酸脱氢酶，苏氨酸合成酶，2-氨基-3-酮丁酸辅酶 A 连接酶，丝氨酸羟甲基转移酶加过量，200 μL 体系，37℃下反应。为了在体外清楚明确的验证苏氨酸循环固碳途径，需要寻找合适的方法进行分析。最直接的验证方法就是测定途径所有中间代谢物的碳摩尔数，如果其和大于初始加入底物的碳摩尔数则表明通过该途径固定了 CO_2。但苏氨酸循环固碳途径中的很多中间代谢物无法准确定量测定，因此不能根据这种方法进行苏氨酸循环途径的体外固碳验证。苏氨酸循环固碳途径中乙酰 CoA 为关键目的代谢物，需要寻找能证明途径循环的关键酶。如图 3，以 5 mmol/L 的丙酮酸为底物，加入苏氨酸循环固碳途径中除丝氨酸脱氨酶以外的其他酶，可以生成 1.5 mmol/L 的乙酰 CoA，若加入苏氨酸循环途径中的所有酶，仅有 0.5 mmol/L 的乙酰 CoA 生成。原因可能是在苏氨酸循环固碳途径中，苏氨酸为中间代谢物，被丝氨酸脱氨酶利用，生成 2-酮丁酸。为了减少丝氨酸脱氨酶对中间 代谢物苏氨酸的利用，可以采用分段加入丝氨酸脱氨酶的方法，目的是先积累丝氨酸，再加入丝氨酸脱氨酶使丝氨酸转化为丙酮酸，再次进入循环，因此，我们可以采用一种简化的分段加入丝氨酸脱氨酶的方法进行验证，通过加入丝氨酸脱氨酶前后乙酰 CoA 浓度的变化在体外分析苏氨酸循环固碳途径。

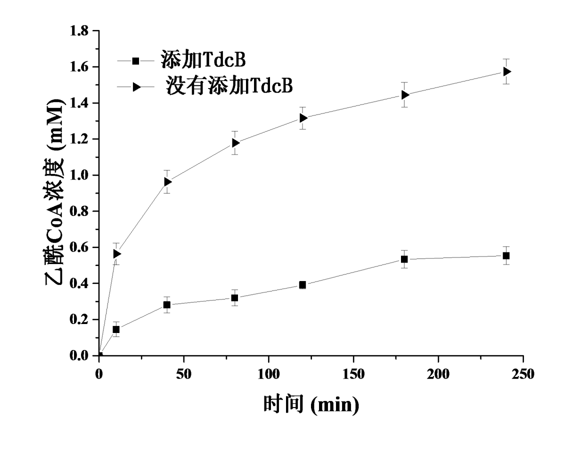


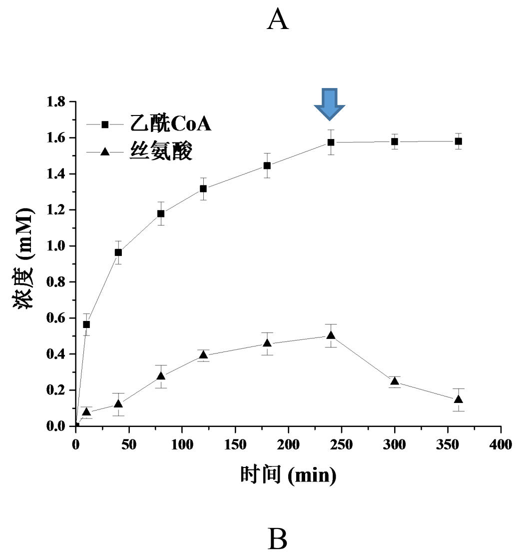
图 3 丝氨酸脱氨酶（TdcB）对苏氨酸循环固碳途径中合成的乙酰 CoA 浓度的影响

Fig. 3 Serine deaminase (TdcB) to the influence of the concentration of the synthesis of acetyl CoA in the threonine cycle carbon fixation.

"Cube" means adding all enzymes including TdcB in the threonine cycle carbon fixation pathway, "triangles" means adding enzymes other than TdcB in the threonine cycle carbon fixation pathway.

分段加酶的方法分为两步，第一步加入苏氨酸循环固碳途径中除丝氨酸脱氨酶之外的酶，测定乙酰CoA和丝氨酸的量，第二步为当乙酰CoA和丝氨酸的量达到反应平衡时，加入丝氨酸脱氨酶，测定乙酰CoA的量。如图4A，反应开始加入苏氨酸循环固碳途径中除丝氨酸脱氨酶之外的其他酶，240 min时，生成的乙酰CoA达到平衡，加入丝氨酸脱氨酶，120 min后，丝氨酸的浓度在减少，乙酰CoA的浓度没有增加。理论上丝氨酸的浓度减少说明了有丙酮酸的生成，因此乙酰CoA的浓度也会有所增加，但是实验结果表明并没有乙酰CoA的生成，可能是因为加入的丝氨酸脱氨酶与苏氨酸脱氢酶竞争性的利用了中间代谢物苏氨酸，生成了不能合成乙酰CoA的2-酮丁酸。

A



B

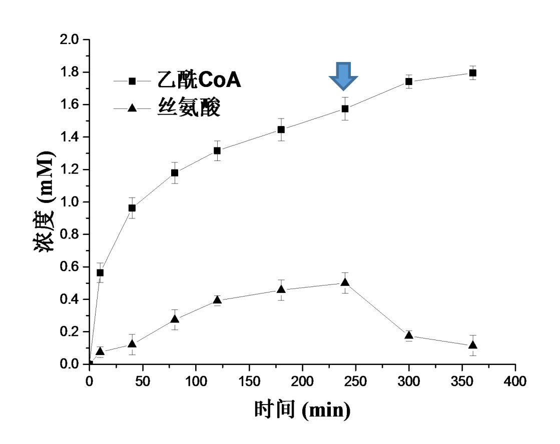


图 4 加入丝氨酸脱氨酶前后，丝氨酸和乙酰 CoA 随时间变化的曲线

Fig.4 Before and after the addition of serine deaminase , the serine and acetyl-CoA curves were recorded

A. 0~240min, add in addition to the serine deaminase enzymes in the reaction system, 240min,add 0.5U/mL serine deaminase ,” square” shows cocentration of acetyl CoA,” triangle” shows cocentration of serine . B. 0~240min, add in addition to the serine deaminase enzymes in the reaction system, 240min, adding 0.5U/mL serine deaminase and 0.5U/mL threonine dehydrogenase” square” shows cocentration of acetyl CoA,” triangle” shows cocentration of serine.” arrow” shows the time of adding the serine deaminase.

为了解决苏氨酸被丝氨酸脱氨酶利用的问题，需要提高苏氨酸脱氢酶对苏氨酸的利用，减少丝氨酸脱氨酶对苏氨酸的利用，我们通过提高苏氨酸循环固碳途径中加入的苏氨酸脱氢酶的酶浓度，即在240 min时，在加入0.5 U/mL丝氨酸脱氨酶的同时再补加0.5 U/mL的苏氨酸脱氢酶。如图4B，120 min后，乙酰CoA的浓度增加了约0.2 mmol/L，通过提高苏氨酸脱氢酶的浓度，更多的苏氨酸被苏氨酸脱氢酶利用，生成了乙酰CoA，0.2 mmol/L的乙酰CoA是在加入丝氨酸脱氨酶之后，生成的丙酮酸再次进入循环产生的，因此，乙酰CoA浓度的增加可以推断体外苏氨酸循环途径实现了固碳。

3.结论

本研究在体外构建了苏氨酸循环途径，由于中间代谢物无法全部准确测量，无法直接验证，因此需要寻找简化的方法进行分析。苏氨酸循环固碳途径中乙酰CoA为关键目的代谢物，可以通过直接测定乙酰CoA进行分析验证，但需要寻找能证明途径循环的关键酶。丝氨酸脱氨酶既可以利用丝氨酸又可以利用苏氨酸，如果开始的反应体系中加入丝氨酸脱氨酶，丝氨酸脱氨酶会利用部分苏氨酸，影响体外打通苏氨酸循环固碳途径。为了减少丝氨酸脱氨酶对苏氨酸的利用，采用

了分段加入丝氨酸脱氨酶的方法，先加入途径中除丝氨酸脱氨酶之外的所有酶，再加入丝氨酸脱氨酶，将丝氨酸转化为丙酮酸，再次进入循环。根据丝氨酸脱氨酶加入前后丝氨酸和关键目的产物乙酰CoA的浓度变化，可以得出结论，苏氨酸循环途径在体外是可以打通的。

参考文献：

[1] H. Earle Swim ,Lester O. Krampitz.Acetic acid oxidation by Escherichia coli;evidence for the occurrence of a tricarboxylic acid cycle[J].Journal of Bacteriology, 1954, 67(4)：419–425.

[2] Trainer MA,Charles TC.The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes[J].Appl Microbial Biotechnology, 2006, 71(4):377-86.

[3] Priyanka Sharma,Bijender Kumar Bajaj.Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus PS 10*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 241–248.

[4] T. Hanai. Engineered Synthetic Pathway for Isopropanol Production in *Escherichia coli* [J]. Appled and Environmental Microbiology, 2007, p7814–7818.

[5] Sabrina Hoffmeister，Marzena Gerdom．Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*．Metabolic Engineering , 2016, 36 (2016) 37–47.

[6]Antje May, Ralf-Jörg Fischer. A modified pathway for the production of acetone in *Escherichia coli* [J].Metabolic Engineering, 2013, 15 (2013) 218–225.

[7] Zhenquan Lin, Yan Zhang ,Qianqian Yuan, et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for poly (3-hydroxybutyrate) production via threonine bypass [J].Microb Cell Factary, 2015, 14: 185.

[8] Orth JD,Conrad TM,Na J, et al. comprehensive genome-scale reconstruction of *E.coli* metabolism—2011[J]. Mol Syst Biol, 2011,7:535.

[9] Szczesiul, M. and Wampler, D. E. Regulation of a metabolic system in vitro: synthesis of threonine from aspartic acid [J]. Biochemistry, 1976, 15, 2236–2244.

[10] Christophe CHASSAGNOLE, Badr RAI$S, Eric QUENTIN, et al. Integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli* [J]. Biochemical Journal, 2001, 356, 415–423.

[11] Tonya N. Zeczycki , Ann L. Menefee , Sarawut Jitrapakdee ,et al. Activation and inhibition of pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli* [J]. Bio chemistry, 2011, 15; 50(45): 9694–9707.

[12] Burman, J.D., Harris, R.L., Hauton, K.A., et al. The iron-sulfur cluster in the L-serine dehydratase TdcG from Escherichia coli is required for enzyme activity [J]. FEBS Lett, 2004, 576: 442–444.

[13] Xiao Zhang , Elaine Newman .Deficiency in L-serine deaminase results in abnormal growth
and cell division of Escherichia coli K-12. Molecular Microbiology, 2008, 69(4), 870–881.

[14] Robert M. Cicchillo, Melissa A. Baker, Eric J. Schnitzer, et al. *Escherichia coli* L -Serine Deaminase Requires a 4Fe-4S] Cluster in Catalysis [J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2004, pp. 32418–32425.

[15] Grabowski R, Hofmeister AE, Buckel W. Bacterial L-serine dehydratases: a new family of enzymes containing iron-sulfur clusters [J]. Trends Biochem Sci. 1993, 18(8):297-300.